

Lab. Diergeneesmiddelen 1981-12-11  
VERSLAG 81.94 Pr.nr. 404.0060

Onderwerp: Controle wachttijden.

Bijlagen: 2

Verzendlijst: directeur, sektorhoofden (3x), direktie VKA, afd.  
Microbiologie, afd. Normalisatie (Humme), Project-  
beheer, Van Bruchem, direktie VKA (H.J. Mol), direktie  
VZ (T. van Ingen), IPS (C.A. Kan)

Project: Onderzoek naar het voorkomen, gehalte en stapeling van  
diverse diergeneesmiddelen in landbouw- en visserijprodukten

Onderwerp: Controle wachttijden

Bijlagen: 2

---

Doel:

De aanwezigheid van een diergeneesmiddel in krop, maag of darm kan een indicatie zijn dat de wachttijd niet in acht is genomen.

Bij dit onderzoek is nagegaan of arprinocid is aan te tonen in krop, maag en darm van kippen die gevoederd zijn met arprinocidhoudend voeder.

Samenvatting:

Extracten van krop, maag en darm zijn onderzocht m.b.v. HPTLC en HPLC. Met de gebruikte HPTLC methode was geen arprinocid aantoonbaar. Met de HPLC methode is 5 mg/kg in de krop en 1,5 mg/kg in de maag en in de darm aangetoond.

Conclusie:

Arprinocid is aantoonbaar in de krop, maag en darm van kippen die tot de slacht gevoederd zijn met arprinocid bevattend voeder.

Omdat met de HPTLC methode geen arprinocid aantoonbaar is, zullen tevens monsters van het op het bedrijf aanwezige voeder onderzocht moeten worden, om te bepalen welk diergeneesmiddel eventueel aanwezig kan zijn in de krop, maag en darm.

---

Verantwoordelijk: drs F.G. Buizer

Medewerker/Samensteller: M.A. Visser-Meijer

### Inleiding

Tot nu toe stond in de verordening van het Produktschap voor Veevoeder bij sommige additieven-diergeneesmiddelen wel een "wachttijd vóór het slachten" vermeld, maar er was niet voorgeschreven dat die ook aangehouden moest worden. Per 1982-01-01 zal dit verplicht worden.

In dit kader is een onderzoek gedaan naar de aanwezigheid van arprinocid in de krop, maag en darm van kippen, nadat zij tot de slacht gevoederd waren met arprinocid bevattend voeder.

Men gaat hierbij van de veronderstelling uit dat, wanneer meer dan een spoor van een diergeneesmiddel wordt aangetoond, zeker wanneer dat in de krop of de maag is, de wachttijd niet in acht is genomen.

### Verslag van het onderzoek

Bij het onderzoek van mengvoerders op aanwezigheid van diergeneesmiddelen wordt gebruik gemaakt van een DLC methode (2). In eerste instantie werd daarom ook bij dit onderzoek gedacht deze methode toe te passen. Omdat in dit geval bekend was, welk diergeneesmiddel (arprinocid) aanwezig kon zijn, werd een voor dit diergeneesmiddel specifieke extractie methode gebruikt nl. een extractie met fosfaatbuffer en chloroform (1). Daar slechts een kleine hoeveelheid onderzoekmateriaal ter beschikking stond, werden in plaats van DLC-platen HPTLC-plaatjes gebruikt, zodat, door de grotere gevoeligheid van deze plaatjes, van minder materiaal kon worden uitgegaan.

### HPTLC-methoden

1. 1 g krop- resp. 1 g maaginhoud worden geextraheerd met 2,5 ml 0,1 M fosfaatbuffer en 5 ml chloroform.

5 g darm wordt geextraheerd met 12,5 ml 0,1 M fosfaatbuffer en 25 ml chloroform.

Deze oplossingen worden 1 uur geschud en vervolgens gecentrifugeerd. Van de chloroformfase worden resp. 2,5, 2,5 en 12,5 ml ingedampt, waarna het residu wordt opgenomen in 1 ml chloroform. Evenzo worden monsters behandeld waaraan arprinocid is toegevoegd (300 µg). Van de residuen worden 30 µl op een HPTLC-plaatje (kiezelgel zonder fluorescentieindicator) gebracht. Ook wordt een standaard arprinocid opgebracht (3 µg).

Gebruikte loopvloeistof: tolueen-ijsazijn-aceton-water (60-24-8-2,5). Na drogen worden de plaatjes besproeid met fluram (0,01% in aceton). Arprinocid is dan onder UV-licht (365 nm) te zien als een lichtblauwe vlek op een donkere achtergrond.

Resultaat:

Bij de monsters zijn erg veel verontreinigingen te zien. Standaard en toevoegingen zijn zichtbaar. In de monsters is geen arprinocid aantoonbaar.

2. Van het onder 1 verkregen extract de chloroformfase indampen en het residu opnemen in 50 ml methanol. Dit extract zuiveren over een aluminiumoxidekolom (2). Elueren met ethanol 96%. De gezamenlijke methanol/ethanol extracten indampen en het residu oplossen in 1 ml chloroform.

Wederom 30 µl op de plaat gebracht.

Resultaat:

De monsterextracten zijn iets schoner geworden. Ook hier alleen standaard en toevoegingen te zien.

3. Van het onder 1 verkregen extract de chloroformfase indampen en het residu opnemen in 5 ml 0,1 N HCl. Dit wordt uitgeschud met 5 ml hexaan (1). De zoutzuurfase neutraliseren tot pH = 7 met 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (ca 2,5 ml). Deze oplossing extraheren met 10 ml chloroform. De chloroformfase indampen en het residu opnemen in 1 ml chloroform. Wederom 30 µl op de plaat gebracht.

Resultaat:

De extracten van krop en maag zijn tamelijk zuiver; die van de darm minder. Ook hier zijn alleen standaard en toevoegingen te zien.

4. Uitgaan van grotere hoeveelheid materiaal gaf geen verbetering van de resultaten. De verontreinigingen in de monsterextracten maakten het onmogelijk kleine hoeveelheden arprinocid (< 3 µg) aan te tonen. Ook een voorzuivering van de op de plaat gebrachte monsters met ether (arprinocid blijft aan start) en een twee-dimensionale ontwikkeling brachten geen verbetering.



### HPLC-methoden

2,5 g kropinhoud wordt geextraheerd met 12,5 ml 0,1 M fosfaatbuffer en 25 ml chloroform.

Van de maag- resp. darminhoud wordt 5 g geextraheerd met 25 ml 0,1 M fosfaatbuffer en 50 ml chloroform.

Na 1 uur schudden wordt de oplossing gecentrifugeerd. Van de chloroformfase wordt resp. 20 ml, 40 ml en 40 ml ingedampt. Het verkregen residu wordt opgelost in 10 ml 0,1 N zoutzuur, waarna een zuivering plaatsvindt door uit te schudden met 10 ml hexaan.

Van de zoutzuurfase wordt 5 ml gepipetteerd, welke geneutraliseerd wordt met 2,5 ml 0,2 M natriumcarbonaat in methanol. Van de verkregen oplossing wordt 50 µl geïnjecteerd in een HPLC-systeem.

HPLC condities: golflengte	262 nm
kolom	µ Bondapack C 18
eluens	methanol-water 50/50 v/v
elutiesnelheid	1 ml/min.
gevoeligheid	0,01.

De waarden worden berekend m.b.v. een standaard oplossing arprinocid. Voor de bepaling van de recovery laat men een standaard de gehele bepaling doorlopen.

Aan een hoeveelheid maag- en darminhoud wordt arprinocid toegevoegd, waarna de bepaling wordt uitgevoerd. Als blanco's worden gebruikt de krop-, maag-, en darminhoud van kippen die gevoederd zijn met monensin bevattend voeder. Hierop worden recovery proeven uitgevoerd. De chromatogrammen worden gegeven in de bijlage.

### Resultaten

Recovery proeven	in %	gemiddeld
standaard	109 - 104 - 104	106%
krop	104 - 106	105%
maag	79? - 94	94%
darm	101 - 126?	101%

Gehalte arprinocid in µg/g produkt

	krop	maag	darm
"blanco" kippen	niet aantoonbaar	niet aantoonbaar	niet aantoonbaar
"arprinocid" kippen	5,0	1,2	1,7

Conclusie

Arprinocid is aantoonbaar in de krop-, maag- en darminhoud van kippen die tot de slacht gevoederd zijn met arprinocid bevattend voeder. Omdat met de HPTLC methode geen arprinocid aantoonbaar is, zullen tevens monsters van het op het bedrijf aanwezige voeder onderzocht moeten worden, om te bepalen welk diergeneesmiddel eventueel aanwezig kan zijn in de krop, maag en darm.

Discussie

Nu gebleken is dat het mogelijk is een diergeneesmiddel aan te tonen in de krop, maag en darm, zal ook nagegaan moeten worden of dit het geval is wanneer wel één of meer dagen gevoederd is met een voeder dat geen diergeneesmiddel bevat.

Voor b.v. arprinocid is de wachttijd 5 dagen. Hiervoor zou dan een proefopzet moeten komen waarbij kippen onderzocht worden die resp. 1, 2, 3, 4 en 5 dagen met diergeneesmiddelvrij voeder zijn gevoederd. Wanneer blijkt dat na één dag reeds geen diergeneesmiddel meer aantoonbaar is zal het moeilijk worden om na te gaan of de gehele wachttijd in acht is genomen. Voeder voor één dag is nog wel in zakken aan te voeren, zodat het voorstelbaar is dat slechts één dag wachttijd in acht wordt genomen.

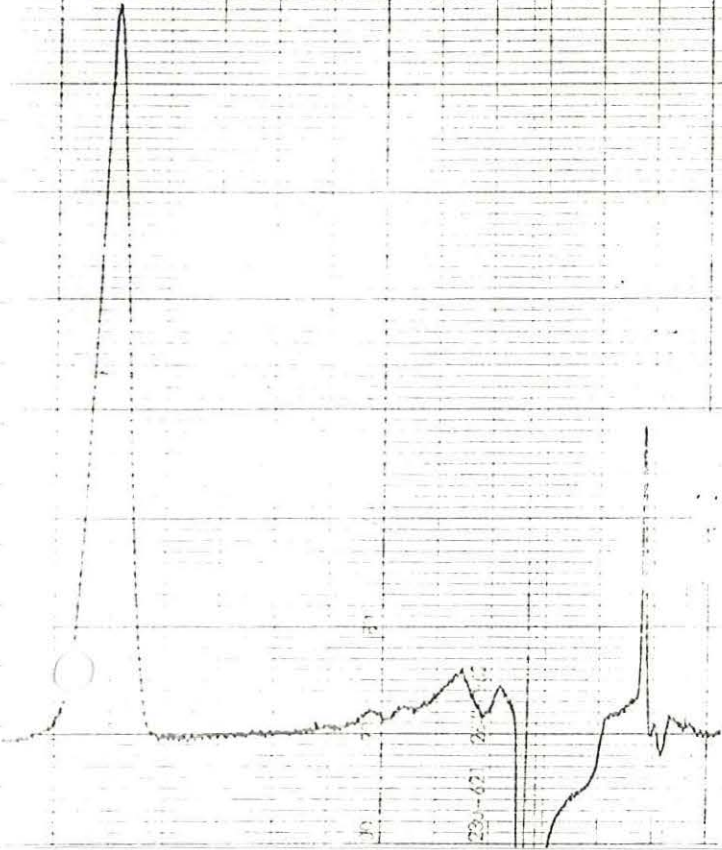
## Bijlage 2.

### Literatuur

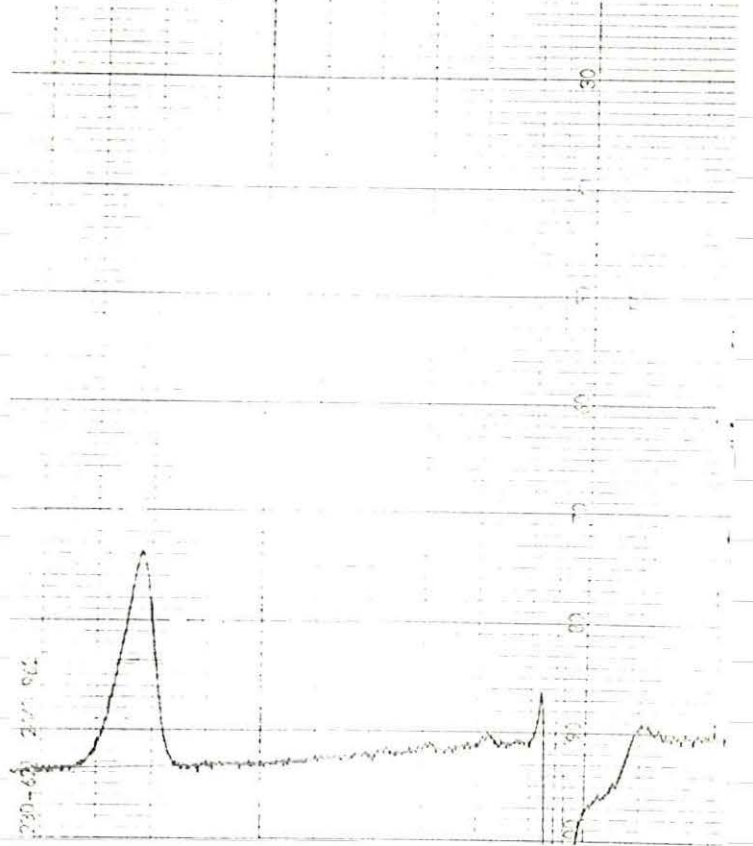
1. Bepaling van arprinocid in diervoeders. Intern analysevoorschrift nr. Dgm 3.
2. Identificatie van coccidiostatica en enkele andere chemotherapeutica in mengvoeders m.b.v. dunnelaag chromatografie. EEG voorschrift 311/VI/77.

# bølge 1 CHROMATOGRAMMEN

standard aspirinacid

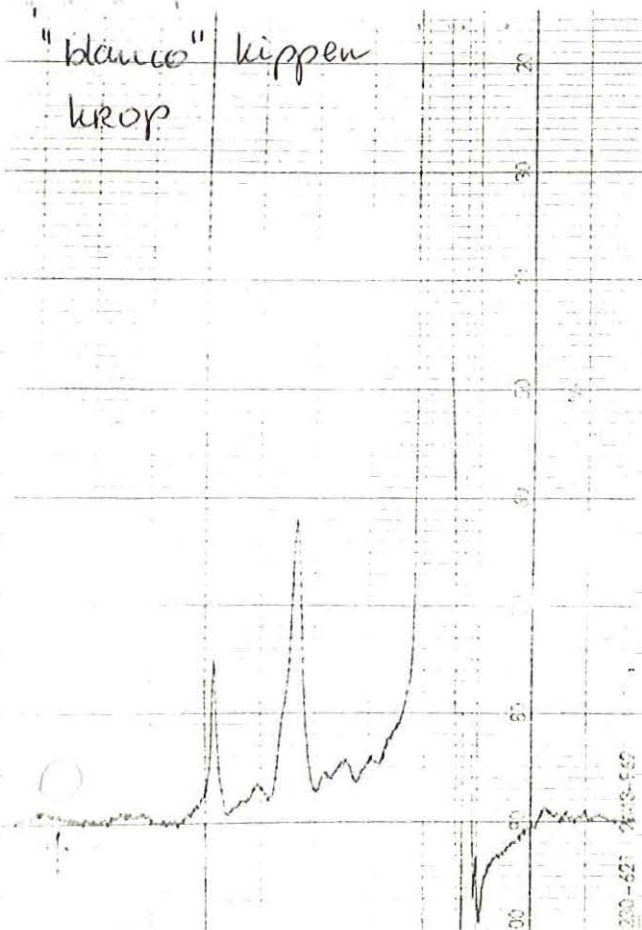


recovery standard

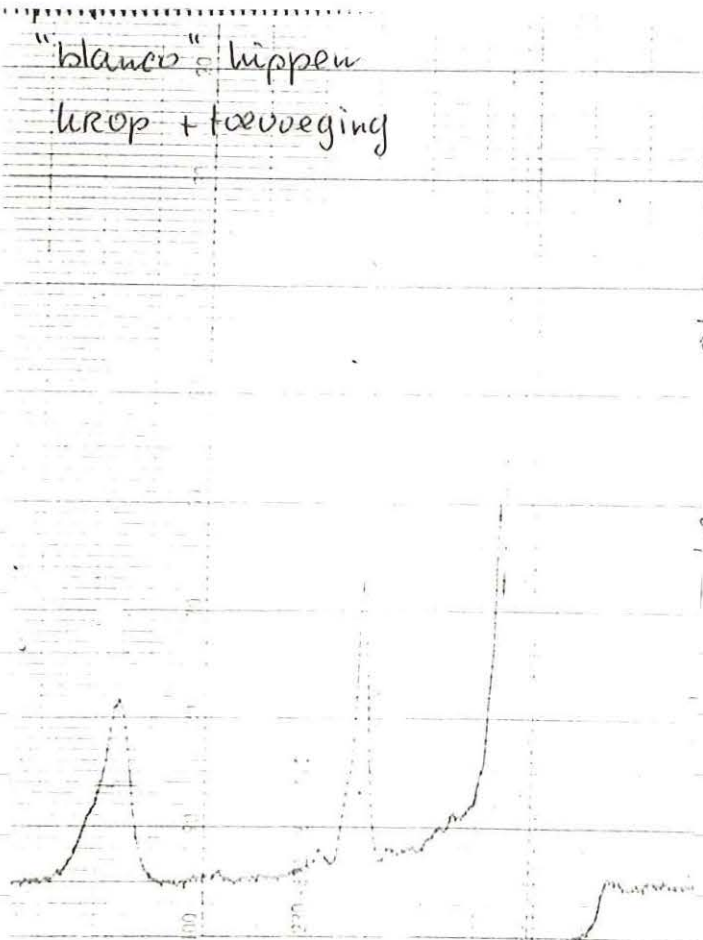




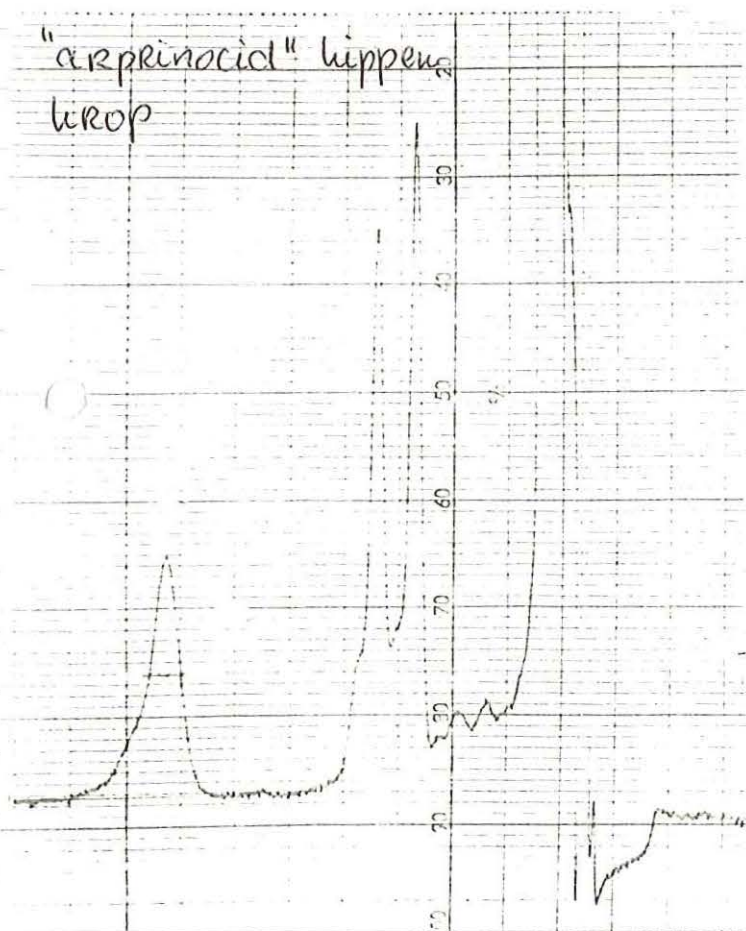
"blanco" kippen  
krop



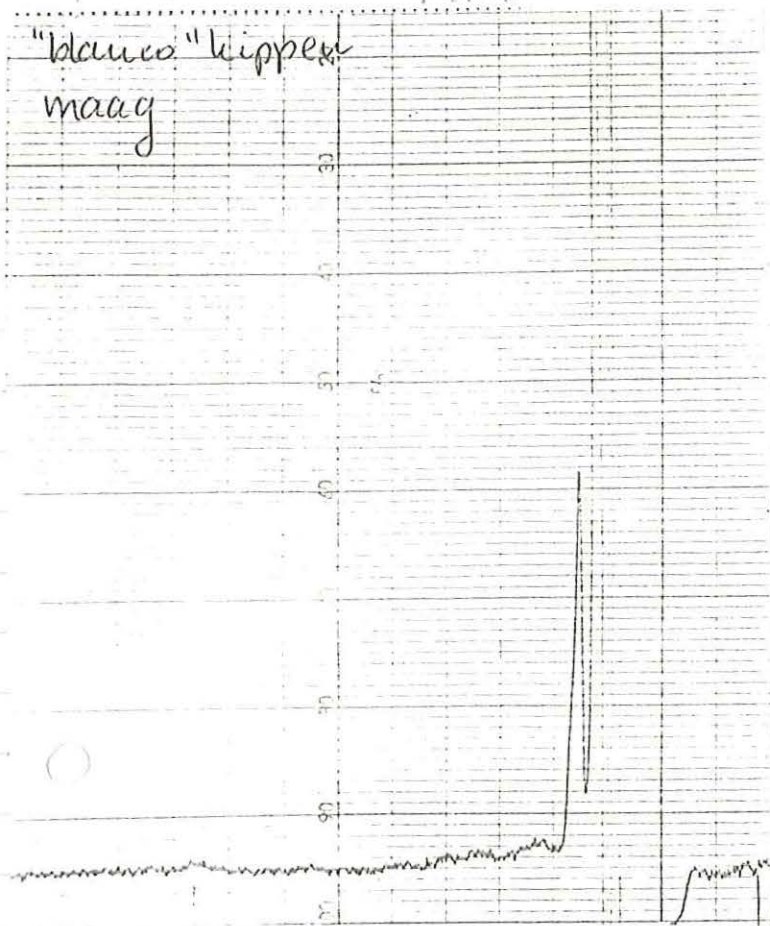
"blanco" kippen  
krop + toevoeging



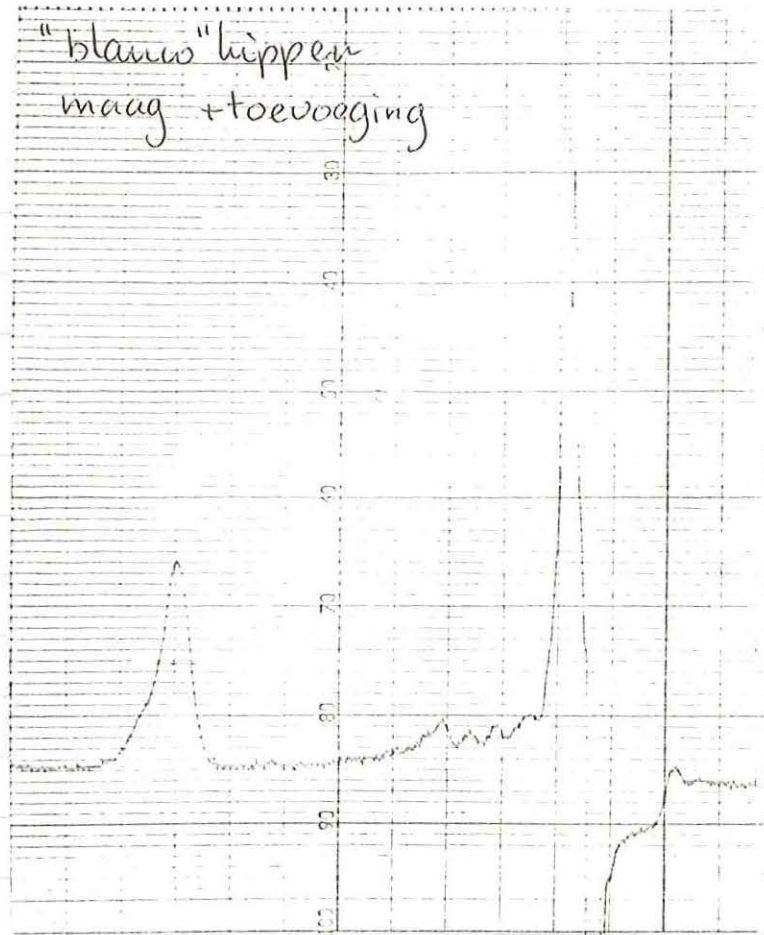
"arprinocid" kippen  
krop



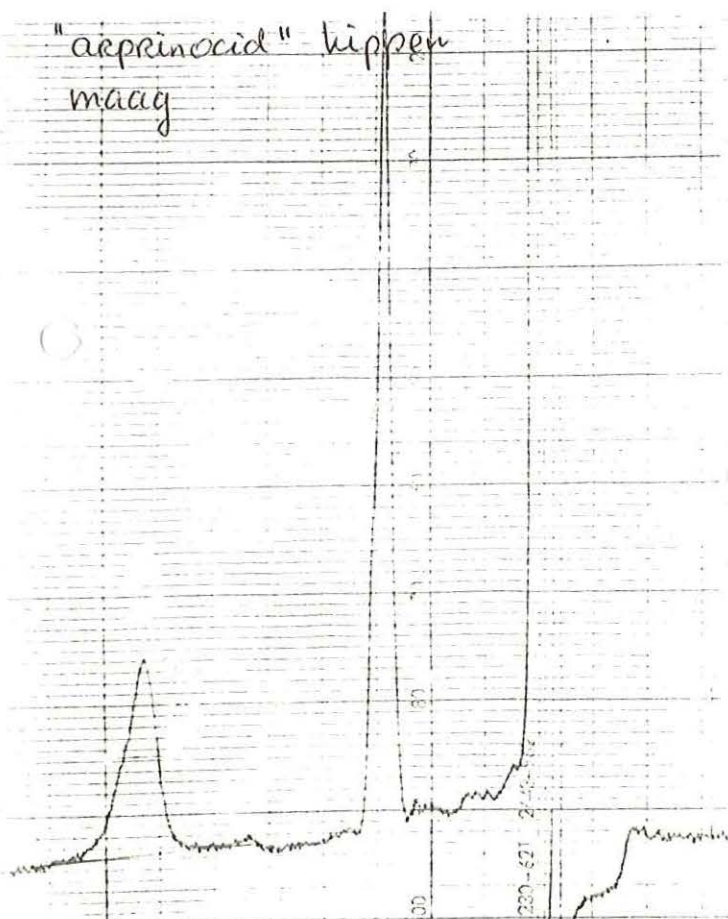
"blanco" kippen  
maag



"blanco" kippen  
maag + toevoeging



"aspirinacid" kippen  
maag



"aspirinacid" kippen  
maag + toevoeging

